

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 07025768
PUBLICATION DATE : 27-01-95

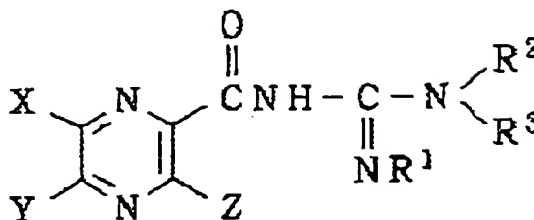
APPLICATION DATE : 09-07-93
APPLICATION NUMBER : 05170466

APPLICANT : MITSUBISHI CHEM CORP;

INVENTOR : MITSUYA MASAYUKI;

INT.CL. : A61K 31/495 A61K 31/535 A61K 31/55
C07D241/26 C07D241/44

TITLE : SUPPRESSING AGENT FOR
HYPERPLASIA OF VASCULAR
ENDOSPORIUM



ABSTRACT : PURPOSE: To obtain the suppresser useful for preventing and treating arteriosclerotic diseases, arteritis, etc., containing a specific amyloid derivative as an effective component and having activities suppressing growth and wandering of cultured smooth muscle cells and hyperplasia of vascular endosporium.

CONSTITUTION: The suppresser contains an amyloid derivative of the formula [X is H, halogen, trihalomethyl, 1-6C alkyl, 3-6C cycloalkyl, (substituted) phenyl, etc.; Y is H, halogen, hydroxyl, mercapto, 1-5C alkoxy, etc.; Z is (substituted) ammno; R¹ is H, or 1-6C alkyl; R² and R³ are H, (substituted) 1-6C alkyl or phenyl; R² and R³ form pyrrolidiny, morpholino, piperidino or piperaziny] as an effective component. Here, a dose of this inhibitor is preferably in the range of 1-500mg/day per adult.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-25768

(43) 公開日 平成7年(1995)1月27日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 31/495	A B N	9454-4C		
31/535	A B X	9454-4C		
31/55		9454-4C		
C 07 D 241/28				
241/44				

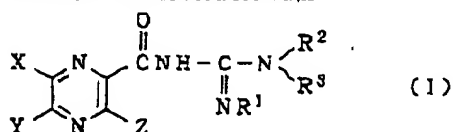
審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全11頁)

(21) 出願番号	特願平5-170488	(71) 出版人	000005968 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22) 出願日	平成5年(1993)7月9日	(72) 発明者	長江 三重子 神奈川県横浜市長区鶴志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
		(72) 発明者	三津家 正之 神奈川県横浜市長区鶴志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
		(74) 代理人	井理士 長谷川 晴司

(54) 【発明の名称】 血管内臓肥厚抑制剤

(57) 【要約】 (修正有)

【構成】 一般式 (I) で示されるアミロライド誘導体を有効成分とする血管内臓肥厚抑制剤。



【式中、XはH、Cl、CF₃、C₁～6アルキル、C₁～6シクロアルキル、(置換)フェニル、ベンジルチオ等；YはH、NH₂、Cl、ジメチルアミノ、ベンジルアミノ、アニリノ、ピロリジノ、ピペラジノメトキシ、メチルチオ等；Zは(置換)アミノ基；R¹はH、C₁～6アルキル；R²、R³はH、C₁～6アルキル、フェニル；をそれぞれ表し、あるいはXとYが一緒になって-(CH₂)₄-又は-CH=CH-CH=CH-を、及びR²とR³がそれらが結合しているN原子と共にピロリジノ、モルホリノ、ピペリジノ、ピペラジノ環を形成してもよい】

【効果】 本発明の血管内臓肥厚抑制剤は培養平滑筋細

胞の増殖、遊走および血管内臓肥厚を抑制する作用を有し、動脈硬化性疾患、動脈炎、PTCAの術後における血管の再狭窄に対して有効であり、血管の異常によって引き起こされる各種疾患を治療または予防することができる。

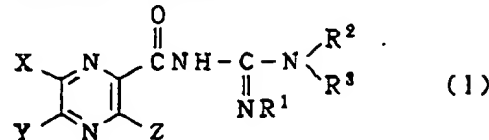
(2)

特開平7-25768

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アミロライド誘導体を有効成分とする血管内膜肥厚抑制剤。

【請求項2】 アミロライド誘導体が、下記一般式＊



【上記式中、Xは水素原子、ハロゲン原子、トリハロメチル基、C₁～C₄のアルキル基、C₃～C₄のシクロアルキル基、置換基を有していてもよいフェニル基、アニリノ基、フェニル基で置換されていてもよいC₁～C₃のアルキルチオ基またはフェニル基で置換されていてもよいC₁～C₃のアルキルスルホニル基を表し、Yは水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、メルカプト基、C₁～C₃のアルコキシ基、C₁～C₃のアルキルチオ基、C₁～C₃のアルキル基、C₃～C₄のシクロアルキル基、置換基を有していてもよいフェニル基または-NR⁴R⁵（式中、R⁴は水素原子、C₁～C₃のアルキル基またはC₃～C₄のアルケニル基を表し、R⁵は水素原子、アミノ基、アミジノ基、C₃～C₄のシクロアルキル基、置換基を有していてもよいC₁～C₃のアルキル基、C₃～C₄のアルケニル基または置換基を有していてもよいフェニル基を表すが、R⁴とR⁵が一緒になってメチレン基の1つがイミノ基で置換されていてもよいC₁～C₃のアルキレン基を表してもよい。）を表す。またXとYが一緒になってテトラメチレン基または1,3-ブタジエニレン基を表してもよい。Zは置換基を有していてもよいアミノ基を表し、R¹は水素原子またはC₁～C₃のアルキル基を表す。R²およびR³はそれぞれ独立して水素原子、置換基を有していてもよいC₁～C₃のアルキル基またはフェニル基を表すが、R²とR³が一緒になって窒素原子とともにピロリジニル基、モルホリノ基、ピペリジノ基またはピペラジニル基を形成してもよい。】

【請求項3】 Xがハロゲン原子を表し、Yが-NR⁴R⁵を表し、Zがアミノ基を表し、R¹、R²およびR³が水素原子を表すことを特徴とする請求項2記載の血管内膜肥厚抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は血管内膜肥厚抑制剤に関し、詳細にはアミロライド誘導体を有効成分とする血管内膜肥厚抑制剤に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 狭心症、心筋梗塞等の病態発症は、それに先行して生ずる冠動脈硬化症が大きな原因であることが知られている。動脈硬化によって生じる内腔の狭小化や血管の弾性消失

* (1) で表されることを特徴とする請求項1記載の血管内膜肥厚抑制剤。

【化1】

が、心筋組織への栄養および酸素不足をもたらし、上記病態を誘導する。血管内腔の狭小化は、泡沫化マクロファージやコレステロールの内腔への蓄積に加え、血管中膜平滑筋細胞の内腔への遊走、内腔での増殖によって生じる細胞線維性内膜肥厚が、その大きな原因であると言われている。

【0003】 狭心症、心筋梗塞の治療としては、抗血栓薬や血管拡張薬等が症状改善を主たる目的として使用されているが、動脈硬化によって招来される血管内腔の狭小化や弾性の消失を根本的に治療するには至っていない。またその他でも、前期病態を治療可能にしている医薬品は現在のところ知られていない。そのため、血管の狭小化をもたらしている内膜肥厚を防止あるいは治療することの可能な医薬品が切望されている。

【0004】 近年、狭小化した血管を外科的に治療する方法として、経皮的冠動脈拡張術（Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty: PTCA）が普及しつつある。PTCA術は、大股動脈などからバルーンカテーテルを遠隔的に挿入してゆき、狭窄部でバルーンを膨らませ、物理的に血管を拡張させるものである。しかしこの治療法の場合、施行後3～6ヵ月で再び狭窄が起きることがある。この再狭窄では、コレステロールの沈着は観察されず、むしろそのほとんどを平滑筋細胞やこの細胞が産生する細胞間マトリックスによって構成された、いわゆる細胞線維性内膜肥厚である。

【0005】 そのため、PTCA術後の再狭窄防止、ひいては動脈硬化の治療法としては、血管内腔で生じる平滑筋細胞の遊走、増殖を抑制することが有効であると考えられた。かかる課題を解決するべく、薬剤の探索が行われているが（特開昭57-38715号、特開平2-121922号、特開平3-83923号、特開平3-83957号、特開平3-118383号、特開平4-99775号、特開平4-154720号各公報等）、未だ開発に至っていないのが現状である。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記課題を解決する目的で検討を重ねてきた結果、Na⁺/H⁺交換輸送系、Na⁺チャネル、Na⁺/Ca²⁺交換輸送系、プロテインキナーゼC、蛋白質合成、チロシンキナーゼ、Na⁺/K⁺-ATPase等に対して阻害作

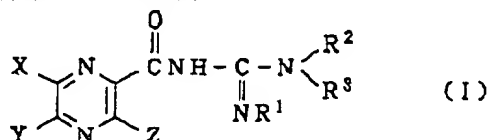
(3)

特開平7-25768

3

用を有することが知られていたアミロライド誘導体が、PDGFや血清によって惹起される培養平滑筋細胞の増殖、遊走作用および血管内膜肥厚を抑制することを初めて見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち本発明の要旨は、アミロライド(N-アミノ-3, 5-ジアミノ-6-クロロピラジンカルボキサミド)誘導体を有効成分とする血管内膜肥厚抑制剤に存する。以下、本発明につき詳細に説明す*



【0009】(上記式中、Xは水素原子；フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等のハロゲン原子；トリフルオロメチル基等のトリハロメチル基；メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基等のC₁~C₄のアルキル基；シクロプロピル基、シクロブチル基等のC₃~C₄のシクロアルキル基；フェニル基、4-クロロフェニル基等の置換基を有していてもよいフェニル基；アニリノ基；メチルチオ基、ベンジルチオ基等のフェニル基で置換されていてもよいC₁~C₄のアルキルチオ基またはメシル基、ベンジルスルホニル基等のフェニル基で置換されていてもよいC₁~C₄のアルキルスルホニル基を去し、Yは水素原子；フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等のハロゲン原子；ヒドロキシ基；メルカプト基；メトキシ基、エトキシ基等のC₁~C₂のアルコキシ基；メチルチオ基等のC₁~C₂のアルキルチオ基；メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基等のC₁~C₄のアルキル基；シクロプロピル基、シクロブチル基等のC₃~C₄のシクロアルキル基；フェニル基、4-クロロフェニル基等の置換基を有していてもよいフェニル基または-NR¹R²(R¹は水素原子；メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基等のC₁~C₄のアルキル基またはビニル基、アリル基等のC₁~C₆のアルケニル基を去し、R²は水素原子；アミノ基；アミノ基；シクロプロピル基、シクロブチル基等のC₃~C₄のシクロアルキル基；メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、シクロプロピルメチル基、ベンジル基、4-メチルベンジル基、2, 2, 2-トリフルオロエチル基、2-ヒドロキシエチル基等の置換基を有し

る。本発明の血管内膜肥厚抑制剤は、アミロライド誘導体を有効成分とする。かかるアミロライド誘導体としては、ピラジノイルグアニジンを骨格とするものであれば特に制限はされないが、例えば下記一般式(1)で表される化合物が挙げられる。

【0009】

【化2】

ていてもよいC₁~C₆のアルキル基；ビニル基、アリル基等のC₁~C₆のアルケニル基またはフェニル基、4-クロロフェニル基等の置換基を有していてもよいフェニル基を表すが、R¹とR²が一緒になってメチレン基、エチレン基、ヘキサメチレン基、-CH₂NHCH₂CH₂-, -NHCH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂NHCH₂CH₂-等、メチレン基がイミノ基で置換されていてもよいC₂~C₆のアルキレン基を表してもよい。)を表す。またXとYが一緒になってテトラメチレン基または1, 3-ブタジエニレン基を表してもよい。Zはアミノ基、アセトアミド基、イソプロピリデンアミノ基等の置換基を有していてもよいアミノ基を表し、R¹は水素原子またはメチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基等のC₁~C₄のアルキル基を表す。R¹およびR²はそれぞれ独立して水素原子；メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、2-ヒドロキシエチル基、ベンジル基等の置換基を有していてもよいC₁~C₆のアルキル基またはフェニル基を表すが、R¹とR²が一緒になって窒素原子とともにピロリジニル基、モルホリノ基、ピペリジノ基またはピペラジニル基を形成してもよい。)本発明においては、Xがハロゲン原子を表し、Yが-NR¹R²(R¹およびR²は上記定義に同じ。)を表し、Zがアミノ基を表し、R¹が水素原子を表し、R²およびR³が水素原子を表す化合物が好ましく、また、その中でもXが塩素原子を表す化合物が特に好ましい。

【0010】かかる化合物の具体例を、下記表1に示す。

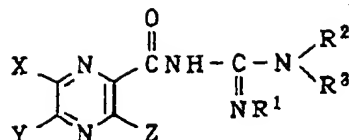
【0011】

【表1】

(4)

特開平7-25768

表 1



化合物No.	X	Y	Z	R ¹	R ²	R ³
1	-Cl	-N(CH ₃) ₂	-NH ₂	-H	-H	-H
2	-Cl	-NHC(NH)NH ₂	-NH ₂	-H	-H	-H
3	-Br	-NH ₂	-NH ₂	-H	-H	-H
4	-I	-NH ₂	-NH ₂	-H	-H	-H
5	-Cl	-NH ₂	-NH ₂	-H	-H	-H
6	-H	-NHC ₆ H ₅	-N=C(CH ₃) ₂	-H	-H	-H
7	-SCH ₂ C ₆ H ₅	-H	-NH ₂	-H	-H	-H
8	-SCH ₃	-H	-NHCOCH ₃	-H	-H	-H
9	-SO ₂ CH ₃	-H	-NH ₂	-H	-H	-H
10	-Cl	-NHCH ₃	-NH ₂	-H	-H	-H



[0012]

[表2]

(5)

特開平7-25768

7
表1 (つぎ)

化合物No.	X	Y	Z	R ¹	R ²	R ³
11	-Cl	-NHCH(CH ₃) ₂	-NH ₂	-H	-H	-H
12	-Cl	-NHCH ₂ CH=CH ₂	-NH ₂	-H	-H	-H
13	-Cl	-NHCH ₂ - 	-NH ₂	-H	-H	-H
14	-Cl	-NH- 	-NH ₂	-H	-H	-H
15	-Cl	-NHCH ₂ C ₆ H ₅	-NH ₂	-H	-H	-H
16	-Cl	-NHCH ₂ CP ₃	-NH ₂	-H	-H	-H
17	-Cl	-NHCH ₂ CH ₂ OH	-NH ₂	-H	-H	-H
18	-Cl	-NHC ₈ H ₅	-NH ₂	-H	-H	-H
19	-Cl	-N(CH ₃)C ₂ H ₅	-NH ₂	-H	-H	-H
20	-Cl	-N(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	-NH ₂	-H	-H	-H
21	-Cl	-N(C ₂ H ₅)CH(CH ₃) ₂	-NH ₂	-H	-H	-H

[0013]

[表3]





(6)

特開平7-25768

9

10

表1 (つづき)

化合物No.	X	Y	Z	R ¹	R ²	R ³
22	-Cl		-NH ₂	-H	-H	-H ;
23	-Cl		-NH ₂	-H	-H	-H
24	-Cl	-N(CH ₃)NH ₂	-NH ₂	-H	-H	-H
25	-Cl	-OH	-NH ₂	-H	-H	-H
26	-Cl	-OCH ₃	-NH ₂	-H	-H	-H
27	-Cl	-SCH ₃	-NH ₂	-H	-H	-H
28	-Cl	-Cl	-NH ₂	-H	-H	-H
29	-CH ₃	-CH ₃	-NH ₂	-H	-H	-H
30	-H	-CH ₃	-NH ₂	-H	-H	-H
31	-H		-NH ₂	-H	-H	-H
32		-H	-NH ₂	-H	-H	-H

[0014]

[表4]

(7)

特開平7-25768

L1

L2

表1 (つづき)

化合物No	X	Y	Z	R ¹	R ²	R ³
33	-H	-C ₃ H ₅	-NH ₂	-H	-H	-H
34	-C ₆ H ₅	-H	-NH ₂	-H	-H	-H
35	-C ₆ H ₅	-Cl	-NH ₂	-H	-H	-H
36	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -		-NH ₂	-H	-H	-H
37	-CH=CH-CH=CH-		-NH ₂	-H	-H	-H
38	-Cl	-NH ₂	-NH ₂	-H	-CH ₂ CH ₂ OH	-H
39	-Cl	-NH ₂	-NH ₂	-H	-C ₆ H ₅	-H
40	-Cl	-NH ₂	-NH ₂	-H	-CH ₂ C ₆ H ₅	-H
41	-Cl	-NH ₂	-NH ₂	-H	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₃
42	-Cl	-NH ₂	-NH ₂	-H	-CH ₃	-CH ₃
43	-Cl	-NH ₂	-NH ₂	-H	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	

【0015】

【表5】


(8)

特開平7-25768

13

14

表1 (つづき)

化合物No.	X	Y	Z	R ¹	R ²	R ³
44	-Cl	-NH ₂	-NH ₂	-H	-CH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ -	
45	-Cl	-NH ₂	-NH ₂	-CH ₃	-CH ₃	-H
46	-Cl	-NHC ₃ H ₇	-NH ₂	-H	-H	-H
47	-Cl	-NHCH ₂ CH(CH ₃) ₂	-NH ₂	-H	-H	-H
48	-Cl	-N(C ₂ H ₅) ₂	-NH ₂	-H	-H	-H
49	-Cl	-N 	-NH ₂	-H	-H	-H
50	-Cl	-N(CH ₃)CH ₂ CH=CH ₂	-NH ₂	-H	-H	-H

【0016】上記一般式(1)で表される化合物は、N^{a+}/H⁺ 交換輸送系阻害作用等を有する化合物として既知の化合物であり(J. Membr. Biol., 105, 1-21 (1988); J. Biol. Chem., 262, 9088-9092 (1987); Mol. Pharmacol., 30, 112-120 (1986); 蛋白質 核酸 酵素, 34, 1251-1266 (1989)), 文献(J. Med. Chem., 8, 638-642 (1965); J. Med. Chem., 10, 66-75 (1967); J. Med. Chem., 12, 285-287 (1969); USP 3300494号; GB 1066855号; USP 4087526号等)に記載の方法、またはそれに基づいて合成することができる。

【0017】本発明の血管内臓肥厚抑制剤は、それ自身を単独の有効成分として、もしくは公知の製剤技術により経口投与用または非経口投与用の製剤とすることができる。経口投与用の剤型としては、例えば錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤等の固形製剤や、溶液剤、シロップ剤、エリキシル剤、油性ないし水性の懸濁液等が挙げられる。非経口投与用の剤型としては、注射用液剤、凍結乾燥剤等の注射剤等が挙げられる。

【0018】これらの製剤を調整するにあたっては、通

常の製剤化に用いられる賦形剤、精製剤、各種溶剤、界面活性剤等を添加することができる。本発明の血管内臓肥厚抑制剤の投与量は、その投与方法、症状、投与時間、投与期間等によって異なるが、一般に成人1日あたり1~5000mg、好ましくは1~500mgであり、必要に応じて1~3回に分けて投与することができる。

【0019】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、その要旨を越えない限り以下に限定されるものではない。なお化合物(アミロライド誘導体)は、いずれもGB 1066855号公報に記載の方法に従って合成した。

実施例1 ラットにおける内臓肥厚抑制作用

血管内臓を肥厚させるために、内皮を剥離する。モデル動物として、スプラグッドウリウ系雌性ラット(日本チャールズリバー社製)8ヵ月齢(体重490~700g)を使用した。左外頰動脈から左冠動脈へフォガティ2Fバルーンカテーテル(バクスター社製)を挿入し、バルーンを膨らませながら抜くことによって内皮を完全に剥離した。処置後、外頰動脈は結紮した。

【0020】ラットは、内皮剥離12日後に屠殺した。

屠殺1時間前に3%エバンスブルー1mlを静注し、青

(9)

特開平7-25768

15

色染色部位、すなわち総動脈の内皮非再生部位のみを評価に用いた。総動脈は、取り出した後6~8カ所を切り出し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定後、常法に従ってパラフィン薄切標本を作製した。評価は新生内臓と中臓の面積をデジタイザ（グラフテック社製）で測定し、薬物非投与群と比較した。

表2

系 物 (表1の化合物No.)	濃 度 ($\mu\text{g/hr}$)	内 臓 面 積 (mm^2)	内臓/中臓 N
コントロール		0.142 ± 0.008	1.07 ± 0.08 6
5	25	0.108 ± 0.014	0.83 ± 0.10 6
21	100	0.085 ± 0.002	0.68 ± 0.10 3

実施例2 ラットにおける血管平滑筋細胞の増殖および遊走抑制作用

スプラグドウリユー系雄ラット（日本チャールズリバー社製）4ヵ月齢（体重480~600g）の左総動脈の内皮を、実施例1と同様にして剥離した。血管平滑筋細胞（以下「VSMC」と略記する）の標識には、プロモデオキシウリジン（シグマ社製：以下「BrdU」と略記する）を用いた。BrdUはチミジンのアナログで、S期（DNA合成期）にある細胞に取り込まれる。薬物およびBrdUは、内皮剥離時にそれぞれ浸透圧ポンプ（薬物（2ML1：アルザ社製）、BrdU（1003D：アルザ社製））にて背部皮下に留置し※

*【0021】試験に供した薬物は、内皮剥離3日前より浸透圧ポンプ（2ML2：アルザ社製）にて腹腔内へ留置した。結果を下記表2に示す。

【0022】

【表6】

※た。BrdUは、240mg/mlとなるようにジメチルスルホキシド（DMSO）で溶解した後蒸留水にて2倍に希釈し使用した。

【0023】ラットは内皮剥離5日後に屠殺し、固定を70%エタノール中で24時間行う以外は実施例1と同様にして、標本を作製した。評価は、抗BrdU抗体（ベクトンデッキンソン社製：1/100）およびABCキット（ベクター社製）で染色してBrdU陽性細胞数を顕微鏡下に計測し、以下の式より遊走細胞率を算出した。

【0024】

【数1】

内臓BrdU陽性細胞数

$$\text{遊走細胞率 (\%)} = \frac{\text{内臓BrdU陽性細胞数}}{(\text{内臓} + \text{中臓}) \text{BrdU陽性細胞数}} \times 100$$

(内臓+中臓) BrdU陽性細胞数

★【表7】

結果を下記表3に示す。

【0025】

表3

系 物 (表1の化合物No.)	濃 度 ($\mu\text{g/hr}$)	総BrdU陽性細胞数	遊走細胞率 (%)
コントロール		195.8 ± 43.1	10.7 ± 2.8
5	21	137.5 ± 25.9	8.7 ± 2.3

実施例3 培養平滑筋細胞のDNA合成抑制作用

ウイスター系雄ラット（日本チャールズリバー社製）6週齢の胸部大動脈から中膜平滑筋層を取り出し、explant法にて培養した。すなわち、単離した中膜を1mm²のexplantとし、12ウェルのプレート（コースター社製）にはりつけ、10%牛胎児血清を含むDulbecco modified Eagle's medium（フロー社製：以下「DMEM」と略記する）の中で2~3週間、37℃の条件下にてインキュベータ（95%空気+5%CO₂）で培養した。初代培

養平滑筋細胞は25cm²のフラスコ（コーニング社製）にて10%牛胎児血清を含むDMEM中で培養され、サブコンフルエントな状態で継代した。試験には、サブコンフルエントな状態にある5~9代の細胞を用いた。

【0026】上記平滑筋細胞を96ウェルプレート（コースター社製）に5×10⁴平滑筋細胞/100μl/ウェルの割合で播種した。細胞がくつつくまで数日間放置した後、5%乏血小板血清を含むDMEMでウェルを洗い、同培地に交換し、24時間以上培養した。この条

(10)

特開平7-25768

17

18

件下では、平滑筋細胞は細胞周期がG₀（休止期）に向かい、新たに分裂しなくなることが知られている。

【0027】S期への誘導は、薬物添加9時間後に10 ng/mlの血小板由来因子（PDGF）で16時間行った。薬物はDMSOで1モルに溶解後、5%胎児血清を含むDMEMで1ミリモルに調整したものを原液とし、薬物は5~400 μMに希釈して使用した。評価*

*には、cell proliferation kit（アマシャム社製）を使用し、BrdUで2時間標識した。

【0028】結果を下記表4に示す。

【0029】

【表8】

表4

薬 物 (表1の化合物No.)	IC ₅₀ (μM)
5	82.2
21	8.8
49	11.3

実施例4 培養平滑筋細胞の増殖抑制作用

実施例3と同様にして平滑筋細胞を準備し、96ウェルプレート（コースター社製）に3.2×10⁵平滑筋細胞/80 μl/ウェルとなるように播種した。細胞は37℃の条件下にてインキュベータ（95%空気+5%CO₂）で培養し、4時間後に薬物を希釈した培地20 μlを添加した。薬物は1モルのDMSOに溶解した後、培地で25ミリモルに調整したものを原液とし、以後順次5倍希釈を繰り返し、最終濃度5ミリモルから10マイクロモルについて検討した。

※【0030】細胞は3日間培養し、試験最終日にMTT法（J. Immun. Meth., 65, 55-63（1983））で測定した。すなわち、5 mg/mlのMTTを10 μl/ウェルの割合で添加し、4時間培養した後培地を捨て、生成したホルマザンの結晶を0.04NのHCl/イソプロパノールで溶解し、吸光度を測定した。

【0031】結果を下記表5に示す。

【0032】

【表9】

表5

薬 物 (表1の化合物No.)	IC ₅₀ (μM)
5	295
21	63.6
49	34.6

実施例5 培養平滑筋細胞の遊走抑制作用

ウシ頸動脈中膜平滑筋細胞は、ラットの培養と同様に播種し培養した。細胞は0.2%ウシ血清アルブミンを含むDMEMで洗った後、4×10⁵平滑筋細胞/mlに調整した。

【0033】48ウェルのマイクロケモタキシスチャンパー（Neuro Probe製）の下室にケモアトラクタントとして10 ng/mlのPDGFと薬物を入れ、上室には10⁵平滑筋細胞/ウェルと薬物を入れた。薬物は1モルをDMSOで溶解した後、0.2%ウシ血清アルブミンを含むDMEMで200マイクロモル

に調整したものを原液として、希釈して使用した。細胞は37℃の条件下にてインキュベータ（95%空気+5%CO₂）中で4時間遊走させた。4時間後、フィルター上側の遊走しなかった細胞をかきとり、ディフクイック（染色液：国際試薬（株）社製）で固定、染色の後、走査型デンストメータ（島津製作所製：CS-9000）で測定した。

【0034】結果を下記表6に示す。

【0035】

【表10】

表6

薬 物 (表1の化合物No.)	IC ₅₀ (μM)
--------------------	--------------------------

(11)

特開平7-25768

19

20

5	888
21	68.7
49	59.2

【0036】

【発明の効果】本発明の血管内膜肥厚抑制剤は、PDGFや血清によって惹起される培養平滑筋細胞の増殖、遊走および血管内膜肥厚を抑制する作用を有することから、脳動脈硬化症、冠動脈硬化症、末梢動脈硬化症等の

動脈硬化性疾患、動脈炎、PTCAの術後における血管の再狭窄に対して有効であり、血管の異常によって引き起こされる前記の各種疾患を治療または予防することができる。

-45-

CLAIMS

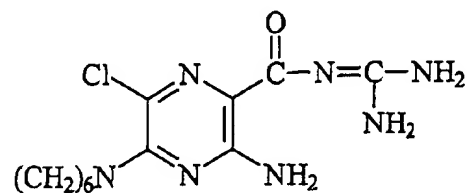
1. Use of an agent for the manufacture of a medicament for reducing, retarding
or otherwise inhibiting the functional activity of HIV, which HIV has infected a
5 mammalian host cell, wherein the agent down-regulates a membrane ion channel
functional activity of said host cell.
2. Use according to claim 1 wherein said membrane ion channel is a Vpu ion
channel.
- 10 3. Use according to claim 1 or 2 wherein said HIV functional activity is HIV
replication.
4. Use of an agent in the manufacture of a medicament for the therapeutic and/or
15 prophylactic treatment of HIV infection and/or AIDS in a mammal which agent
reduces, retards or otherwise inhibits the Vpu ion channel functional activity of an
HIV infected cell.
5. Use according to claim 3 wherein said functional activity is the mediation of
20 HIV replication.
6. Use according to any one of the preceding claims wherein said host cell is a
macrophage.
- 25 7. Use according to any one of claims 1 to 5 wherein said host cell is a
monocyte.
8. Use according to any one of the preceding claims wherein said agent is an
amiloride analogue or functional equivalent thereof.
- 30

-46-

9. Use according to claim 8 wherein said amiloride analogue comprises a substitution of the amino group at the 5-position of the pyrazine ring or functional equivalent thereof.

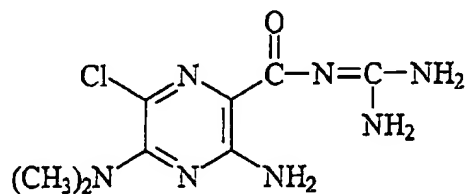
5 10. Use according to claim 9 wherein said amiloride analogue is HMA or functional equivalent thereof.

11. Use according to claim 10 wherein said HMA comprises the structure:



10 12. Use according to claim 9 wherein said amiloride analogue is DMA or functional equivalent thereof.

13. Use according to claim 12 wherein said DMA comprises the structure:



-47-

14. A pharmaceutical composition for use in reducing, retarding or otherwise inhibiting Vpu ion channel functional activity, said composition comprising an agent as defined in accordance with any one of claims 1 to 13 and one or more pharmaceutical acceptable carriers and/or diluents.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.